

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-365272  
(43)Date of publication of application : 18.12.2002

(51)Int.Cl.

G01N 30/34  
G01N 27/62  
G01N 30/26  
G01N 30/72

(21)Application number : 2001-171917  
(22)Date of filing : 07.06.2001

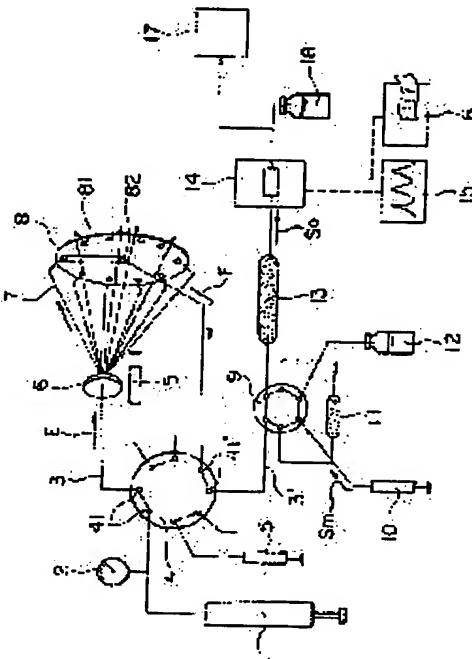
(71)Applicant : NANO SOLUTION:KK  
(72)Inventor : YAMAUCHI YOSHIO  
NATSUME TORU  
ISobe TOSHIaki

(54) LIQUID CHROMATOGRAPH AND ANALYTICAL SYSTEM

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a liquid chromatograph permitting the higher accurate gradient change of an eluate and devised so as to be capable of performing detection or analysis of high sensitivity, to provide an analytical system and gradient elution method.

**SOLUTION:** The liquid chromatograph is equipped with at least a liquid feed means 1 for allowing the eluate E to flow in a predetermined flow rate, a sample injection means 9 for injecting a sample Sm in the eluate E, and a separation column means 13 for separating a solute So contained in the sample Sm. Further, the chromatograph is provided with an eluate selection means 8 for branching the flow channel 3 of the eluate E fed from the liquid feed means 1 of form branch flow channels 7, etc., each having a predetermined volume and temporarily storing eluates E1, E2, etc., different in composition in the branch flow channels 7, etc., and selecting the temporarily stored eluates E1, E2, etc.; and a means for injecting the sample Sm in the selected eluates E1, E2, etc., by the sample injection means 9 to allow the same to flow to the separation column 13 to perform the gradient elution of the solute So. The analytical system wherein the liquid chromatograph is connected to a mass analyzer and the gradient elution method using the liquid chromatograph are also disclosed.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.06.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted/registration]

**[Rate of final disposal for application]**

[Date of final dis]

[Patent Number]

[Number of shares held by the registrant]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

### Rejection]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-365272  
(P2002-365272A)

(43) 公開日 平成14年12月18日(2002.12.18)

(51) Int.Cl.  
G 0 1 N 30/34  
27/62  
30/26  
30/72

### 識別記号

F I  
G O 1 N 30/34  
27/62  
30/26  
30/72

### テーマコード\*(参考)

審査請求 有 請求項の数 4 OL (全 10 頁)

(21)出願番号 特願2001-171917(P2001-171917)  
(22)出願日 平成13年6月7日(2001.6.7)

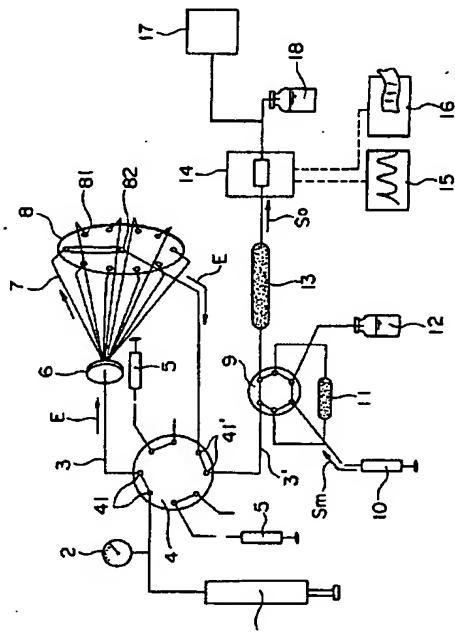
(71)出願人 502108950  
株式会社ナノ・ソリューション  
東京都世田谷区駒沢3-7-20 グリーン  
プラザ2階  
(72)発明者 山内 芳雄  
東京都日野市東豊田3-22-13 豊田第二  
コーポラス403  
(72)発明者 夏目 徹  
東京都目黒区目黒1-17-21-103  
(72)発明者 磐辻 俊明  
東京都八王子市みなみ野5-6-7  
(74)代理人 100112874  
弁理士 渡邊 薫

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ及び分析システム

(57) 【要約】

【課題】 溶離液のより高精度なグラジェント変化を可能にし、高感度の検出又は分析ができるように工夫された液体クロマトグラフ、分析システム及びグラジェント溶離方法を提供すること。

【解決手段】 溶離液Eを所定流量で流す送液手段1と、前記溶離液Eに試料Smを注入する試料注入手段9と、試料Sm中に含まれる溶質S○を分離する分離カラム手段13と、を少なくとも備えた液体クロマトグラフにおいて、前記送液手段1から送られてくる溶離液Eの流路3を分岐させて所定容量の分岐流路7,7…を形成し、該分岐流路7,7…に組成の異なる溶離液E<sub>1</sub>,E<sub>2</sub>…を一時格納し、この一時格納された溶離液E<sub>1</sub>,E<sub>2</sub>…を選択する溶離液選択手段8と、前記試料注入手段9により、選択された溶離液E<sub>1</sub>,E<sub>2</sub>…に試料Smを注入して分離カラム13に流し、溶質S○をグラジエント溶出する手段と、が設けられた液体クロマトグラフとこの液体クロマトグラフを質量分析計に接続した分析システム並びにこの液体クロマトグラフを用いたグラジエント溶離方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 流路中を順次搬送されてくる組成の異なる溶離液によって試料を分離カラムに導入し、前記溶離液の溶出強度に基づいて試料中の溶質をグラジエント溶離する構成の液体クロマトグラフにおいて、

前記溶離液の流路を分岐させて所定容量の分岐流路を形成し、該分岐流路に組成の異なる溶離液を一時格納する溶離液格納手段と、

前記分岐流路に一時格納された溶離液を順次選択し、前記分離カラム側に流す溶離液選択手段と、  
が設けられたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

【請求項2】 バルブの切り替えにより、インジェクターから前記分岐流路のそれぞれに溶離液を充填する手段を備えたことを特徴とする請求項1記載の液体クロマトグラフ。

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載の液体クロマトグラフに質量分析計を接続したことを特徴とする分析検出器。

【請求項4】 請求項1又は請求項2に記載の液体クロマトグラフを用いることを特徴とするグラジエント溶離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グラジエント溶出分析に適した液体クロマトグラフ、該液体クロマトグラフを備える分析検出器、該液体クロマトグラフを用いたグラジエント溶離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 高速液体クロマトグラフ（以下、「HPLC」と称する。）を用いて、溶離液の組成（組成比）を順次変化させて分離カラムに流し、分離カラムに保持された溶質の溶出強度を変化させる、いわゆるグラジエント溶離法（グラジエント溶出法）を利用した分析技術がある。

【0003】 この分析技術は、多大な溶出時間を要する分離が短時間で可能になる、類似の構造の分子を分離することが可能となる等の利点があるので普及している。

【0004】 現在、この分析技術においては、溶離液を  $1 \text{ mL}/\text{min}$  程度の流速で送液するのが一般的であるが、溶離液の流速をより低速化して、試料の検出精度をより高めようとする技術的傾向を背景に、近年、 $5 \mu\text{L}/\text{min}$  程度の低流速条件で溶離液を送液できるように工夫されたHPLCも提案され始めている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、低流速向けに設計されたHPLCは、装置構造が非常に複雑であって、操作が難しいという基本的な技術的課題があった。

【0006】 そして、溶離液が $5 \mu\text{L}/\text{min}$  の流速よりも遅い条件で、グラジエント溶離を行おうとする場合

は、溶離液が搬送される流路を本流路と内口径の小さな支流路に分岐（スプリット）させて、支流路側に分析カラムを接続し、支流路を低流速で流れる溶離液を用いてグラジエント溶離分析を行うという技術を採用することが可能である。

【0007】 しかし、この技術では、支流路において目詰り等が発生しやすく、所定 ( $\text{sub-uL}/\text{min}$ ) の所望の低流速条件を安定に保つことが困難で、しかも設定流量で流れているか否かの確認さえ困難となるため、高精度のグラジエント溶離を行うことができないという技術的課題があった。

【0008】 そこで、本発明は、組成の異なる溶離液を順次安定した低流速条件で確実に送液することによって、溶離液のより高精度なグラジエント変化を可能にし、高感度の検出又は分析ができるように工夫された液体クロマトグラフ、分析検出器及びグラジエント溶離方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】 上記技術課題を解決するために、本発明では、以下の手段を採用する。

【0010】 まず、流路中を順次搬送されてくる組成の異なる溶離液（eluent）によって試料を分離カラムに導入し、前記溶離液の溶出強度に基づいて試料中の溶質（solute）をグラジエント溶離する構成の液体クロマトグラフにおいて、前記溶離液の流路を分岐させて所定容量の分岐流路を形成し、この分岐流路に組成の異なる溶離液を一時格納する溶離液格納手段と、前記分岐流路に一時格納された溶離液を順次選択して前記分離カラム側に搬送する溶離液選択手段と、が設けられた液体クロマトグラフを提供する。

【0011】 より具体的には、（1）一定の流量で溶離液を流す高圧送液手段と、（2）この高圧送液手段によって搬送される溶離液の流路を分岐させて、有機溶媒比、pH、塩濃度その他の組成が異なる溶離液をそれぞれ各分岐流路中に所定量一時格納する溶離液格納手段と、（3）前記分岐流路に一時格納された溶離液を順次選択して分離カラム側に搬送する溶離液選択手段と、

（4）順次搬送されてくる溶離液に試料を注入する試料注入手段と、（5）分離カラムを用いて試料中に含まれる溶質を溶離液の溶出強度に基づいてグラジエント溶離する手段と、を少なくとも備えた液体クロマトグラフを提供する。

【0012】 この液体クロマトグラフは、まず、 $500 \text{ nL}/\text{min}$  以下レベルの極めて低流量条件で、溶離液を順次一定流量で安定かつ確実に流すことができるという基本特性を備えているので、試料中に含まれる溶質成分を高精度にグラジエント溶離することができる。また、溶離液を低流量で流す構成によって、溶離液中の溶質を確実に濃縮させることができるようになる。

【0013】 また、試料注入手段前の流路位置におい

て、組成が異なる溶離液を、所定量分一時格納しておく溶離液格納手段を設けたことによって、必要な組成の溶離液を、必要に応じて、必要なタイミングで、段階的又は連続的に、容易に搬送させることができるグラジエント溶離方法を提供できる。

【0014】次に、本発明に係る液体クロマトグラフでは、送液手段後に設けられる各分岐流路に、バルブの切り替えにより、シリンジで溶離液を充填できる手段を備えるように工夫したので、溶離液の交換又は補充を簡単に行うことができる。

【0015】ここで、前記分岐流路に対する組成の異なる溶離液の充填を、自動制御で行うようにしてもよい。この手段を採用すると、溶離液の充填精度を高めることができる。

【0016】また、分析開始時において、前記分岐流路の吐出口から前記分離カラム手段に至る流路中に、予め組成の異なる溶離液を前記分岐流路から順番に送液し、貯留しておく手段を採用することもできる。この手段によれば、分析開始からより短時間でグラジエント溶離を行うことが可能となるので、分析時間の短縮を達成できる。

【0017】統いて、本発明では、上記した液体クロマトグラフの分離カラム手段に、質量分析計(MASS)を接続した分析検出器、即ちLC/MS(liquid chromatography/mass spectrometry)を提供する。

【0018】この手段では、溶離液の組成を段階的に変えていく段階溶離法又は連続的に変化させていく勾配溶離法のいずれも自在に選択して簡単に行うことができるようになることから、単一組成の溶離液では、溶離が難しいとされた多成分系の試料でも、低速少流量で、短時間で効率よく、分離・検出を行うことができるようになる。

【0019】本発明に係る分析検出器は、少流量、低流速で溶離液を搬送して、高精度に溶質をグラジエント溶離できるように構成された液体クロマトグラフを備えているので、溶質成分の検出を高感度で行うことができるとともに、検出のための積算時間をより長くすることができる。

【0020】この結果、質量分析計の試料分離データのピークの濃度をより高くすることができるようになるので、高感度の質量分析を行うことができるようになる。

【0021】

【発明の実施の形態】本発明の好適な実施形態について、添付図面に基づいて説明する。

【0022】まず、図1は、本発明に係る液体クロマトグラフと該液体クロマトグラフを備えた分析検出器の構成を簡易に表すブロック図である。以下、この図1に基づいて、本発明に係る液体クロマトグラフ及び分析検出器の基本構成について説明する。

【0023】まず、本発明に係る液体クロマトグラフ

は、図1中符号Eで示された溶離液を、n1/minレベルの低流速で安定して送液できる高圧送液ポンプ1を備えている。この高圧送液ポンプ1としては、プランジャー型ポンプ、マイクロシリンジ型ポンプ等を採用することができるが、低流速安定送液により適しているマイクロシリンジ型の送液ポンプ(infusion pump)を採用するのが好ましい。

【0024】例えば、この送液ポンプ1として、米国・Hamilton社製の250μl容量のマイクロシリンジを備える送液ポンプPHD2000(米国・HARVERD APPARATUS社製)を採用することができる。

【0025】なお、本発明に係る液体クロマトグラフの溶離液の送液手段としては、分離カラム13の後に質量分析計が接続される場合を除き、分離カラム13の後方から負圧吸引する手段も採用することも可能である。

【0026】図1に示す符号2は、溶離液Eの圧力を監視・測定するための圧力計である。

【0027】次に、高圧送液ポンプ1から圧送されてくる溶離Eが通過する流路3は、内径0.25mmのステンレス製鋼管で形成することができる。この流路3は、バルブ4の所定のポート41を通過した後、10ポートの多岐管(マニホールド)6に接続され、この多岐管6を介して合計10本の分岐流路7,7…に枝分かれされている。

【0028】なお、分岐流路7,7…の数は、10本に限定するものではなく、分析目的に応じて適宜選択することができる。多岐管6は、VICI社製のZ10M1等を採用することができる。

【0029】本実施形態において、グラジエント発生流路として機能する分岐流路7,7…は、それぞれ内径0.25mm、長さ150mm、容量7.5μLのステンレス製鋼管で形成されており、有機溶媒比、pH、塩濃度その他の組成が異なる溶離液E,E,E…を所定量分一時格納しておく溶離液格納手段として機能する。なお、分岐流路7,7,7…の長さ、容量等は、目的に応じて適宜選択することができる。

【0030】ここで、本発明に係る液体クロマトグラフでは、バルブ4のポート41の開閉切り替えによって、各分岐流路7,7,7…に対して、シリンジから直接溶離液Eを充填できるように工夫してもよい。これにより、配管をその都度調整して溶離液の交換又は補充を行う手間が解消される。

【0031】符号8は、各分岐流路7,7…の各端部が接続された10箇所のポート81を備えるロータリーモードのバルブを示している。このバルブ8は、各分岐流路7に一時格納された組成の異なる溶離液を選択するための手段として機能し、手動操作で、所定のポート81を順次開放することによって、所望の組成の溶離液E<sub>1</sub>,E<sub>2</sub>,E<sub>3</sub>…を、順次後続の装置側に向けて、流すことが

できる構成とされている。なお、バルブ8の出口部分には、図示しないコントローラが接続されており、電気信号により、バルブの選択と開閉を制御している。

【0032】ここで、前記分岐流路に対する組成の異なる溶離液の充填を、自動制御で行うようにしてもよい。具体的には、各分岐流路7に対して、所定組成の溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>…を自動調合作成し、順次自動で各分岐流路7に送液及び格納するようにする。この手段を採用すると、溶離液の充填精度を高めることができるので、分析精度を向上させることができるとなる。

【0033】バルブ8の操作によって選択された溶離液Eは、再び上記バルブ4の所定のポート41'を通過して、試料注入部9に向かうことになる。この試料注入部9においては、予め前調整された試料S<sub>m</sub>をインジェクター（試料注入装置）10を溶離液E'に注入する。

【0034】試料S<sub>m</sub>の注入方法としては、インジェクター10から直接、流路3'中に注入する方法、インジェクター10からトラップカラム11に注入し、このトラップカラム11で濃縮されて試料S<sub>m</sub>を溶離液E'中に送り込む方法のいずれも選択することができる。試料S<sub>m</sub>は溶離液E'によって分離カラム13に搬送される。

【0035】インジェクター10は、耐圧性、耐薬品性、試料S<sub>m</sub>への気泡混入がないように密着性を備える等の条件を満たしているものであれば、適宜選択することができる。図1の符号12は、試料残液槽を示している。

【0036】なお、試料注入部9には、図示しないミキシング装置を付設し、溶離液E'を試料S<sub>m</sub>の混合処理を行うようにしてもよい。このミキシング装置を導入することによって、グラジエントがスムーズにかかり、ピークの巾をほぼ一定にすることができる。また、組成の異なる溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…を拡散し、より直線的なベースラインを形成することができる。

【0037】ここで、図2に示すように、分析開始時ににおいて、前記バルブ8の吐出口82から後述する分離カラムに至る流路3'中に、予め、組成の異なる溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…を各分岐流路7から濃度勾配の順番に送液し、貯留しておくことも可能である。このように工夫すると、分析開始からより短時間でグラジエント溶離を行うことが可能となるので、分析時間を短縮することができる。

【0038】ここで、符号13は、所定の固定相（オクタデシルシラン化学結合型シリカゲル）が充填されている分離カラムを示している。本発明においては、この分離カラム13は、低流速で溶離液E'を流すことに対応して、内口径0.5mm以下のものを採用する。

【0039】分離カラム1においては、溶離液E'中に注入された試料S<sub>m</sub>に含まれる溶質成分S<sub>o</sub>を、固定相に対する親和力の差に基づいて分離するとともに、組成の異なる溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…の溶出強度の変化に基づいて溶出させる。

【0040】即ち、この分離・溶出手順と同じ手順を、上記各分岐流路7に格納された組成の異なる溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…を順次選択して流すことによって、試料成分S<sub>o</sub>の高精度なグラジエント溶離を行うことができる。

【0041】グラジエント溶離された溶質成分S<sub>o</sub>は、吸収光度（UV/VIS）検出器、蛍光（FL）検出器、示差屈折率検出器、電気化学検出器、化学発光検出器、質量分析計その他の検出器14を適宜選択して使用することで、定量、定性その他の分析を行うことができる。

【0042】例えば、検出器14に質量分析計を採用する場合は、高精度のグラジエント溶離が可能な液体クロマトグラフに基づいて、試料成分の高感度検出が可能なLC/MSを提供することができる。なお、液体クロマトグラフと質量分析計とのインターフェースは、ESI（エレクトロスプレー）法、APCI（大気圧化学イオン化法）のいずれも採用することができる。

【0043】なお、図1の符号15は、検出器14に接続される記録計、符号16は検出器14に接続されるデータ処理装置である。符号17は、溶質成分S<sub>o</sub>を分取する場合において、検出器14に接続されるフラクションコレクター、符号18は、廃液槽である。

【0044】

【実施例】実施例1。

溶離液としてアセトンのメタノール溶液を使用して、メタノール中のアセトン濃度を10%ずつ変化させたときのグラジエント変化を500nL/min、300nL/min、100nL/minの各流量別に、紫外線検出器を用いて検証した。なお、本実験では、トラップカラム11、分離カラム13、ミキシング装置は使用していない。

【0045】図3は、実施例2における、記録計15により描かれたベースラインを示す図（グラフ）である。このグラジエントラインに示すように、500nL/min、300nL/min、100nL/minの各流速において安定したグラジエント変化が示され、特に、100nL/minの低流速条件においても、リニアなベースラインを形成できるので、溶離液のリニアなグラジエント変化を達成するのに充分である。

【0046】実施例2。

ミキシング装置を使用し、溶離液としてアセトンのメタノール溶液を使用して、メタノール中のアセトン濃度を変化させたときのグラジエント変化を300nL/min、100nL/minの流量別に、紫外線検出器を用いて検証した。

【0047】図4は、実施例3における、記録計15により描かれたベースラインを示す図（グラフ）である。このベースラインに示すように、300nL/min、

100 nL/minの各低流速条件でも、安定したペースラインを形成でき、低流速条件で、溶離液のリニアなグラジエント変化を達成するのに充分である。

【0048】実施例3。

本発明に係る分析検出器によってペプチドの高感度分析が可能となることを実証するために、実験を行った。使用した試料は、カルモジュリンのトリプシン酵素消化物(Calmodulin trypsin digest)であり、量は150 fmoleである。使用した溶離液は、水、アセトニトリル、ギ酸から構成されたものである。試料注入量は60 nL。試料は、分離カラムに直接導入した。流速は300 nL/minである。なお、質量分析計の測定分子量範囲は600から1500ドルトンである。

【0049】図5は、カルモジュリンのトリプシン酵素消化物に含まれる各質量成分のクロマトグラムを示した図(グラフ)である。様々な質量成分がシャープなピークを形成していることから、明らかに各試料成分が分離されていることがわかる。

【0050】図6は、分離されたトータル質量が最も多い成分をシングルイオンモニター検出した結果、600 attomol (S/N=2) のペプチドを検出できたことを示す図(クロマトグラム)である。

【0051】以上から、本発明に係る分析検出器(LC/MS)では、グラジエント溶離によって、試料成分が高精度で分離されるとともに、分離された成分が高感度に検出できたことがわかる。

【0052】

【発明の効果】本発明により奏される主な効果は次のとおりである。

【0053】(1) 本発明に係る液体クロマトグラフは、500 nL/min以下レベルのごく低流速の溶離液を、順次一定流量で安定かつ確実に流すことができる。試料中に含まれる溶質成分を高精度にグラジエント溶離することが可能となる。

【0054】(2) 本発明に係るグラジエント溶離方法は、試料注入手段前の流路位置において、組成が異なる溶離液を、所定量分一時格納しておく溶離液格納するよう工夫したことによって、必要な組成の溶離液を、必要に応じて、必要なタイミングで、段階的又は連続的に、容易に搬送させることができる。

【0055】(3) 一つの高圧送液ポンプのみを使用

し、バルブの切り替えで各分岐流路に溶離液を送り込むことができるよう構成されているので、複数の高圧送液ポンプを用いて各分岐流路に送液する構成と比べて装置をコンパクト化でき、溶離液の送量に関する制御が単純化し、圧縮率による溶媒の逆流も起らないので正確なグラジエントを達成できる。

【0056】(4) 本発明に係る分析検出器では、低流速で溶離液を搬送して、高精度に溶質をグラジエント溶離できるように構成された液体クロマトグラフを備えているので、溶質成分の分離を高精度に行うことができるとともに、分離成分を高感度に検出できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る液体クロマトグラフと該液体クロマトグラフを備えた分析検出器の構成を簡易に表す図

【図2】溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…が流路3'に貯留された様子を簡略に示す図

【図3】実施例3における、記録計15により描かれたベースラインを示す図(グラフ)

【図4】実施例3における、記録計15により描かれたグラジエントライン(ベースライン)を示す図(グラフ)

【図5】カルモジュリンのトリプシン酵素消化物に含まれる各質量成分のクロマトグラムを示した図(グラフ)

【図6】分離されたトータル質量が最も多い成分をシングルイオンモニター検出した結果、600 attomol (S/N=2) のペプチドを検出できたことを示す図(クロマトグラム)

【符号の説明】

3, 3' (溶離液Eが搬送される) 流路

4 (分岐流路7に溶離液Eを充填するときに使用される) バルブ

5 (分岐流路7に溶離液Eを充填するときに使用される) シリンジ

7 分岐流路

8 (溶離液選択手段である) バルブ

13 分離カラム

14 検出器(質量分析計)

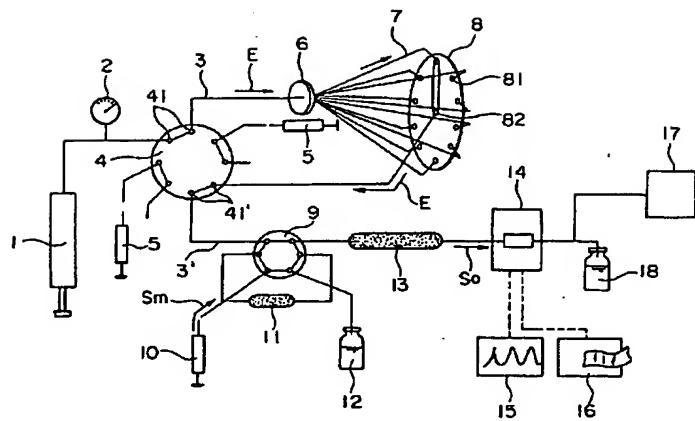
E' 溶離液

S<sub>m</sub> 試料

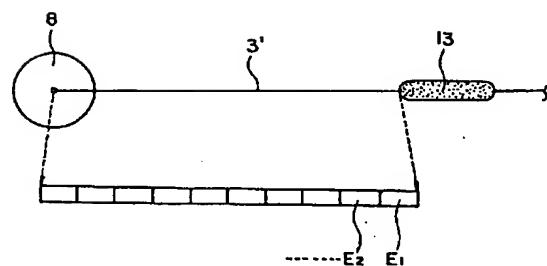
S<sub>o</sub> 溶質(成分)

!(6) 002-365272 (P 2002-36U58

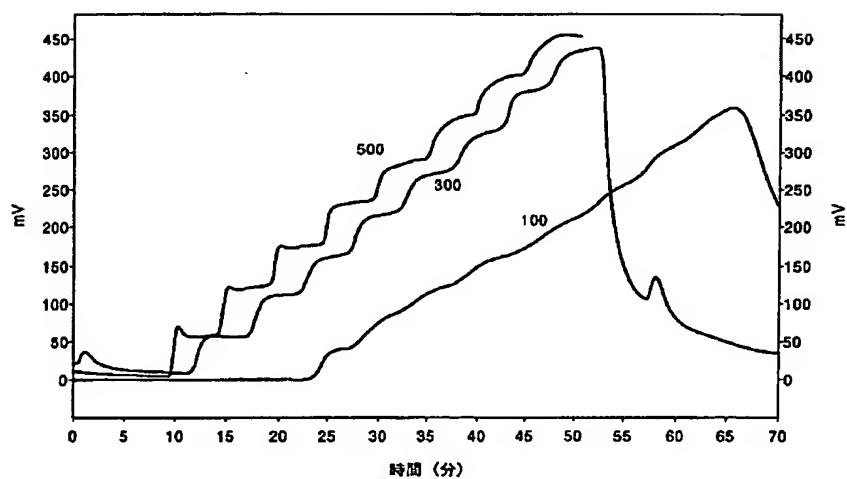
【図1】



【図2】

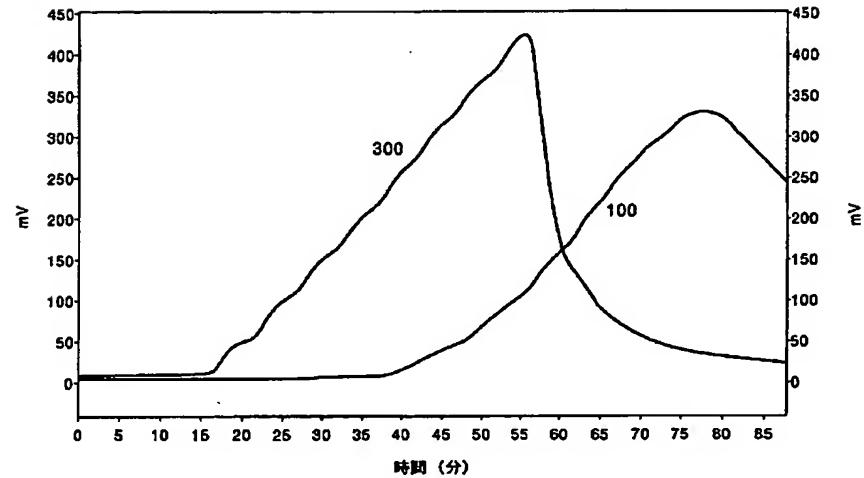


【図3】

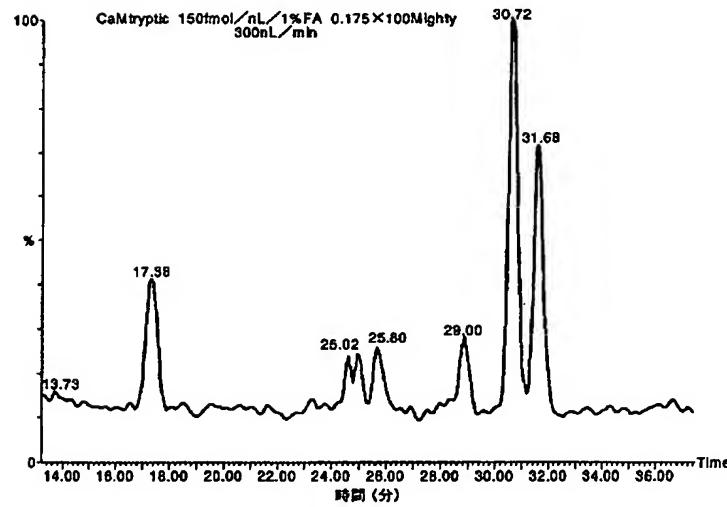


:(7) 002-365272 (P2002-36U58

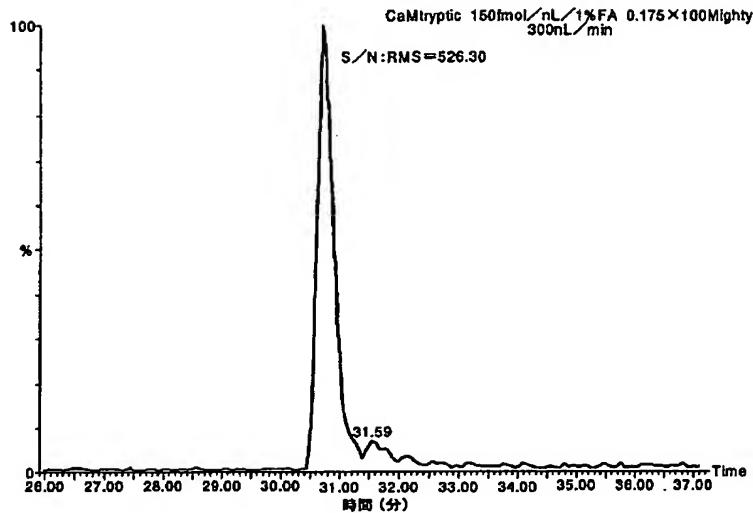
【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成13年6月7日(2001.6.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】符号の説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【符号の説明】

3,3' (溶離液Eが搬送される)流路

4 (分岐流路7に溶離液Eを充填するときに使用される)バルブ

5 (分岐流路7に溶離液Eを充填するときに使用される)シリング

7 分岐流路

8 (溶離液選択手段である)バルブ

13 分離カラム

14 検出器(質量分析計)

E 溶離液

S<sub>m</sub> 試料

S<sub>o</sub> 溶質(成分)

【手続補正書】

【提出日】平成13年6月14日(2001.6.14)

4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項3

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載の液体クロマトグラフに質量分析計を接続したことを特徴とする分折システム。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グラジェント溶出分析に適した液体クロマトグラフ、該液体クロマトグラフを備える分析システム、該液体クロマトグラフを用いたグラジェント溶離方法に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】そこで、本発明は、組成の異なる溶離液を順次安定した低流速条件で確実に送液することによって、溶離液のより高精度なグラジェント変化を可能に

し、高感度の検出又は分析ができるように工夫された液体クロマトグラフ、分析システム及びグラジェント溶離方法を提供することを目的とする。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】統いて、本発明では、上記した液体クロマトグラフの分離カラム手段に、質量分析計(MASS)を接続した分析システム、即ちLC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry)を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】本発明に係る分析システムは、少流量、低流速で溶離液を搬送して、高精度に溶質をグラジェント溶離できるように構成された液体クロマトグラフを備えているので、溶質成分の検出を高感度で行うことができるとともに、検出のための積算時間をより長くすることができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】まず、図1は、本発明に係る液体クロマトグラフと該液体クロマトグラフを備えた分析システムの構成を簡易に表すブロック図である。以下、この図1に基づいて、本発明に係る液体クロマトグラフ及び分析システムの基本構成について説明する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正内容】

【0033】バルブ8の操作によって選択された溶離液Eは、再び上記バルブ4の所定のポート41'を通過して、試料注入部9に向かうことになる。この試料注入部9においては、予め前調整された試料Smをインジェクター(試料注入装置)10を介して溶離液Eに注入する。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正内容】

【0048】実施例3。本発明に係る分析システムによ

ってペプチドの高感度分析が可能となることを実証するために、実験を行った。使用した試料は、カルモジュリンのトリプシン酵素消化物(Calmodulin trypsin digest)であり、量は150 fmoleである。使用した溶離液は、水、アセトニトリル、ギ酸から構成されたものである。試料注入量は60 nL。試料は、分離カラムに直接導入した。流速は300 nL/minである。なお、質量分析計の測定分子量範囲は600から1500ドルトンである。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正内容】

【0051】以上から、本発明に係る分析システム(LC/MS)では、グラジェント溶離によって、試料成分が高精度で分離されているとともに、分離された成分が高感度に検出できたことがわかる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正内容】

【0056】(4) 本発明に係る分析システムでは、低流速で溶離液を搬送して、高精度に溶質をグラジェント溶離できるように構成された液体クロマトグラフを備えているので、溶質成分の分離を高精度に行うことができるとともに、分離成分を高感度に検出できる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る液体クロマトグラフと該液体クロマトグラフを備えた分析システムの構成を簡易に表すブロック図

【図2】溶離液E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>…が流路3'に貯留された様子を簡略に示す図

【図3】実施例3における、記録計15により描かれたベースラインを示す図(グラフ)

【図4】実施例3における、記録計15により描かれたグラジェントライン(ベースライン)を示す図(グラフ)

【図5】カルモジュリンのトリプシン酵素消化物に含まれる各質量成分のクロマトグラムを示した図(グラフ)

【図6】分離されたトータル質量が最も多い成分をシングルイオンモニター検出した結果、600 attomole (S/N=2) のペプチドを検出できることを示す図(クロマトグラム)

(東0) 02-365272 (P2002-36U58

【手続補正書】

【提出日】平成13年6月14日(2001.6.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 液体クロマトグラフ及び分析システム